

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

L3 ANSWER 1 OF 2 CA COPYRIGHT 2003 ACS  
 AN 120:242696 CA  
 TI Enzymic resolution of 1,2-propanediol with Pseudomonas  
 IN Nikaido, Teruyuki; Kawada, Naoki  
 PA Daicel Chem, Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 06030790	A2	19940208	JP 1992-188138	19920715 <--
	JP 3157609	B2	20010416		
PRAI	JP 1992-188138		19920715		
AB	Optical active 1,2-propanediol (I) is prep'd. with Pseudomonas by enzymic resolu. (R)-I is prep'd. from racemate with P. Putida TRB-2 and -4 and Pseudomonas sp. TRP-13 by degrdn. of the (S)-I. (S)-I is prep'd. from racemate with P. Putida TRP-7 by degrdn. of the (R)-I. The physiol. and morphol. characteristics of these Pseudomonas were given.				
IC	ICM C12P041-00				
	ICS C12N001-20				
ICI	C12P041-00, C12R001-38; C12P041-00, C12R001-40; C12N001-20, C12R001-38; C12N001-20, C12R001-40				
CC	16-5 (Fermentation and Bioindustrial Chemistry)				
ST	propanediol enzymic resolu Pseudomonas				
IT	Pseudomonas				
	Pseudomonas putida				
	(enzymic resolu. of propanediol with)				
IT	Resolution				
	(enzymic, of propanediol, with Pseudomonas)				
IT	4254-16-4, DL-1,2-Propanediol, biological studies				
	RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)				
	(enzymic resolu. of, with Pseudomonas)				
IT	4254-14-2P, (R)-1,2-Propanediol, biological studies 4254-15-3P,				
	(S)-1,2-Propanediol, biological studies				
	RL: PREP (Preparation)				
	(prepn. of, with Pseudomonas by enzymic resolu.)				

=>

=> d bib ab 14 1

L4 ANSWER 1 OF 1 WPIDS (C) 2003 THOMSON DERWENT  
AN 1994-079306 [10] WPIDS  
DNC C1994-035959  
TI Prodn. of optically active 1,2-propane- diol - by treating enantiomer  
mixt. of 1,2-propane-diol with microorganisms or their processed prod  
capable of converting enantiomer mixt. to (R)-1,2-propane-diol.  
DC B05 C03 D16 E17 L03  
PA (DAIL) DAICEL CHEM IND LTD  
CYC 1  
PI JP 06030790 A 19940208 (199410)\* 11p <--  
JP 3157609 B2 20010416 (200124) 11p  
ADT JP 06030790 A JP 1992-188138 19920715; JP 3157609 B2 JP 1992-188138  
19920715  
FDT JP 3157609 B2 Previous Publ. JP 06030790  
PRAI JP 1992-188138 19920715  
AB JP 06030790 A UPAB: 19940421  
Prodn. of (R)-1,2-propanediol comprises (a) treating an enantiomer mixt  
of  
1,2-propanediol with a microorganism or its processed prod capable of  
converting an enantiomer mixt of 1,2-propanediol into (R)-1,2-propanediol  
and (b) recovering the remaining (R)-1,2-propanediol.  
Also are new: prodn. of (S)-1,2-propanediol which comprises (a)  
treating an enantiomer mixt of 1,2-propanediol with a microorganism of  
Pseudomonas or its processed prod capable of converting an enantiomer  
mixt  
of 1,2-propanediol into (S)-1,2-propanediol and (b) recovering the  
remaining (S)-1,2-propanediol; and a novel microorganism of pseudomonas  
capable of metabolising and decomposing one of enantiomer of  
1,2-propanediol stereospecifically.  
USE/ADVANTAGE - The 1,2-propanediol is useful as a starting material  
for liq crystals, pharmaceuticals or agrochemicals. The process provides  
optically active 1,2-propanediol in high optical purity.  
Dwg.O/O

=>

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-030790

(43)Date of publication of application : 08.02.1994

(51)Int.Cl.

C12P 41/00  
C12N 1/20  
// (C12P 41/00  
C12R 1:38 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:40 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:38 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:40 )

(21)Application number : 04-188138

(71)Applicant : DAICEL CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 15.07.1992

(72)Inventor : NIKAI DO TERUYUKI  
KAWADA NAOKI

## (54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 1,2-PROPANEDIOL

### (57)Abstract:

PURPOSE: To easily obtain optically active 1,2-propanediol with high optical purity.

CONSTITUTION: Microbes capable of leaving (R)-1,2-propanediol after acting on a 1,2-propanediol enantiomer mixture [e.g. Pseudomonas putida TRB-2 (FERM BP-3879)] (or a treated product thereof) is added to an aqueous solution of a 1,2-propanediol enantiomer mixture to make a reaction at 30° C for 48hr under shaking, and the resultant reaction system is centrifugalized to effect microbial elimination to obtain a supernatant, which is then saturated with sodium chloride followed by extracting the remaining (R)-1,2-propanediol from the supernatant, and the resulting liquid extract is put to desolvation, thus easily obtaining the objective optically active 1,2-propanediol with high optical purity useful as a raw material for liquid crystals or medicines/pesticides such as antibacterial agents.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.09.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3157609

[Date of registration] 09.02.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-30790

(43)公開日 平成6年(1994)2月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 41/00	D	8931-4B		
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 P 41/00				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 P 41/00				

審査請求 未請求 請求項の数4(全11頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-188138

(22)出願日 平成4年(1992)7月15日

(71)出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社  
大阪府堺市鉄砲町1番地

(72)発明者 二階堂 輝之

つくば市花畑2-13-12-508

(72)発明者 河田 直紀

つくば市千現1-14-14-304

(74)代理人 弁理士 古谷 馨 (外3名)

(54)【発明の名称】 光学活性1, 2-プロパンジオールの製法

(57)【要約】

【構成】 1, 2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用し、どちらか一方のエナンチオマーのみを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、1, 2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する光学活性1, 2-プロパンジオールを採取して光学活性1, 2-プロパンジオールを得る。

【効果】 簡便に光学純度の高い光学活性1, 2-プロパンジオールを製造することを可能にさせ、工業的に極めて有利である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して(R)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する(R)-1,2-プロパンジオールを採取することを特徴とする(R)-1,2-プロパンジオールの製法。

【請求項2】 シュードモナス属に属し、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して(S)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する(S)-1,2-プロパンジオールを採取することを特徴とする(S)-1,2-プロパンジオールの製法。

【請求項3】 微生物が、シュードモナス属に属する微生物群から選ばれ、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して(R)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物である請求項1記載の(R)-1,2-プロパンジオールの製法。

【請求項4】 シュードモナス属に属し、かつ、立体特異的に一方のエナンチオマーの1,2-プロパンジオールを代謝、分解する能力を有する微生物群から選ばれた新規な微生物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は光学活性1,2-プロパンジオールの製造法に関する。さらに詳しくは、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用し、どちらか一方のエナンチオマーのみを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を作用させ、残存する光学活性1,2-プロパンジオールを採取することを特徴とする光学活性1,2-プロパンジオールの製造法に関する。光学活性1,2-プロパンジオールは液晶、種々の医薬品、例えば抗菌剤の重要合成原料として有用である。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 従来、光学活性1,2-プロパンジオールを製造する方法としては、(1) 糖類を原料とし、微生物の発酵によって(R)-1,2-プロパンジオールを製造する方法（例えばBIO/TECHNOLOGY, 4, 651-654, 1986）、(2) グリセロールデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼなどの酵素を用いてヒドロキシアセトンを不斉還元し、(R)-1,2-プロパンジオールを製造する方法、あるいは、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に該酵素を作用させて(S)-1,2-プロパンジオールを残存させる方法(J. Org. Chem., 51, 25-36, 1986, Bioorg. Chem., 13, 121-130, 1985)、(3) 1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に酵母を作用させて(S)-1,2-

-プロパンジオールを残存させる方法(J. Mol. Catal., 60, L33-L35, 1990)、(4) 光学活性なルテニウム-BINA P触媒を用いてヒドロキシアセトンを不斉還元する方法（特開昭63-316744号）、(5) 光学活性乳酸エステルを還元する方法や、(6) 光学活性なラクチドを還元する方法（特開平2-72129号）、(7) 光学活性な光学分割剤を用いて光学分割する方法（特開昭61-44888号、特開昭64-75435号）等が知られている。

【0003】 (1) は得られる1,2-プロパンジオールの光学純度は高いが、原料の糖に対して収率が低く、また、培養液中に蓄積する濃度も低い。さらに、副生物も多く1,2-プロパンジオールの精製も容易ではない。(2) は精製した酵素を用いねばならず、また、高価なNAD(P)などの補酵素およびその補酵素を再生するためグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼまたはギ酸デヒドロゲナーゼ等の酵素も必要であり、安価な製造法ではない。(3) は得られる(S)-1,2-プロパンジオールの光学純度が35%e.e.と低い欠点があり、(4) は高価な光学活性触媒を用いねばならないこと、原料のヒドロキシアセトンがラセミ体の1,2-プロパンジオールに比べはるかに高価であるという欠点がある。(5)、(6) はエステル化、あるいはラクチド化した後、高価な還元触媒を必要とし、操作も繁雑である。また、原料のL-乳酸は安価であるが、D-乳酸は高価で、(R)-1,2-プロパンジオールを(S)-1,2-プロパンジオールと同様には得られない。(7) は光学分割剤の合成が困難かつ高価であり、工業レベルでの実施は容易ではない。以上述べたように(1)~(7)の方法は経済的かつ簡便な方法ではなく、安価に光学活性1,2-プロパンジオールを製造する工業的な製法の確立が望まれていた。

【0004】 また、特開平2-128699号において小倉らは、(S)-1,2-ジオールの製法として、1,2-ブタンジオール以上のアルキル鎖長の直鎖の1,2-ジオールについて、1,2-ジオールのエナンチオマー混合物に微生物を作用させ、光学純度の高い(S)-1,2-ジオールを採取する方法を開示しているが、1,2-プロパンジオールについては全く記載されていない。また、同著者等は(Agri. Biol. Chem., 54(7), 1819-1827, 1990)において、1,2-プロパンジオールに微生物を作用させたが、(S)-1,2-プロパンジオールの収率、光学純度とも50%を超えたものはなかったと述べている。このように、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に微生物を作用させ、光学純度の極めて高い1,2-プロパンジオールを採取する方法は、今までまったく知られていなかった。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は経済的に優れ、かつ簡便な方法で光学純度の高い光学活性1,2-プロパンジオールを得る方法として、微生物を作用させる方法に着目し、この目的に適した微生物を広く自然界よ

り検索した結果、シュードモナス属に属する微生物群から選ばれた微生物が、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用し、(R)-1,2-プロパンジオールを残存させること、および、シュードモナス属に属する微生物群から選ばれた微生物が、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用し、(S)-1,2-プロパンジオールを残存させることを見出し、本発明を完成したものである。

【0006】すなわち本発明は、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して (R)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する (R)-1,2-プロパンジオールを採取することを特徴とする (R)-1,2-プロパンジオールの製法を提供するものである。また、本発明は、シュードモナス属に属し、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して (S)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する (S)-1,2-プロパンジオールを採取することを特徴とする (S)-1,2-プロパンジオールの製法を提供するものである。

【0007】更に本発明は、シュードモナス属に属し、かつ、立体特異的に一方のエナンチオマーの1,2-プロパンジオールを代謝、分解する能力を有する微生物群から選ばれた新規な微生物を提供するものである。

【0008】本発明において、(R)-1,2-プロパンジオールを製造する際に使用する微生物としては、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用して (R)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物である限り特に制限されないが、特にシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物群から選ばれる

ものが好ましい。また、(S)-1,2-プロパンジオールを製造する際に使用する微生物としては、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属し、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用し、(S)-1,2-プロパンジオールを残存させる能力を有する微生物である限り特に制限されない。シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物のうち、(R)-体を残存させるものとしては、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRB-2、TRP-4、シュードモナス スピーズ (*Pseudomonas* sp.) TRP-13などが挙げられ、(S)-体を残存させるものとしては、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRP-7などがあげられる。これらの微生物は、野性株、変異株、または細胞融合もしくは、遺伝子操作などの遺伝的手法により誘導される組み換え株など、いずれの株でも好適に用いることができる。また、これらの微生物は、少なくとも一種使用すればよい。

【0009】シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRB-2、TRP-4、シュードモナス スピーズ (*Pseudomonas* sp.) TRP-13、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRP-7株は、本発明者等が自然界より分離したもので、一方のエナンチオマーの1,2-プロパンジオールのみを立体特異的に代謝、分解する能力の高い菌株であり、それぞれ微工研条寄第3879号 (FERMBP-3879)、微工研条寄第3880号 (FERMBP-3880)、微工研条寄第3882号 (FERMBP-3882)、微工研条寄第3881号 (FERMBP-3881) として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。以下にそれらの菌学的性質を示す。尚、下記の記載中、N.T. は試験を行っていないことを示す。

#### 【0010】

(a) 形態	TRB-2株	TRP-4株	TRP-13株
(1) 細胞の形および大きさ	桿 菌	桿 菌	桿 菌
	0.5~0.6 $\mu\text{m}$ $\times$ 1.5~4.0 $\mu\text{m}$	0.6~0.8 $\mu\text{m}$ $\times$ 1.0~3.5 $\mu\text{m}$	0.5 $\mu\text{m}$ $\times$ 1.0~2.5 $\mu\text{m}$
(2) 運動性	+	+	+
(3) グラム染色性	-	-	-
(4) 胞子の有無	-	-	-
(5) 鞭毛	極鞭毛、>1	極鞭毛、>1	極鞭毛、1
(b) 生理学的性質	TRB-2株	TRP-4株	TRP-13株
(1) オキシダーゼ	+	+	+
(2) カタラーゼ	+	+	+
(3) アミノペプチダーゼ	+	+	+
(4) インドールの生成	-	-	-
(5) VPテスト	-	-	-
(6) 硝酸塩の還元	-	-	+
(7) 脱窒反応	-	-	+
(8) ウレアーゼ	±	N.T.	N.T.
(9) フェニルアラニンデアミナーゼ	-	-	-

(10) シュクロースからレバンの生成	—	—	—
(11) レシチナーゼ	—	—	—
(12) チロシンの分解	+	+	N. T.
(13) でんぷんの加水分解	—	—	—
(14) ゼラチンの加水分解	—	—	—
(15) カゼインの加水分解	—	—	—
(16) DNA の加水分解	—	—	—
(17) Tween80 の加水分解	—	—	—
(18) エスクリンの加水分解	—	—	+
(19) 3 %KOH による溶菌	+	+	+
(20) 酸素に対する態度	好氣的	好氣的	好氣的
(21) 4℃での生育	—	—	—
(22) 37℃での生育	+	—	+
(23) 41℃での生育	—	—	—
(24) pH5.6 での生育	+	+	+
(25) Mac-Conkey-Agar 培地での生育	+	+	+
(26) SS-Agar 培地での生育	+	+	+
(27) Cetrimid-Agar 培地での生育	+	+	+
(28) 色素の生成			
蛍光性	+	+	—
ピロシアニン	—	—	—
(29) OFテスト	○	○	○
(30) グルコースからガスの生成	—	—	—
(31) 酸の生成			
グルコース	+	+	+
フルクトース	+	+	+
キシロース	+	+	+
(32) PNPG (β-ガラクトシダーゼ)	—	—	—
(33) アルギニンジヒドロラーゼ	+	+	+
(34) 炭素源の利用			
酢酸	+	+	+
アジピン酸	—	—	+
カプロン酸	+	+	+
クエン酸	+	+	+
グリコール酸	+	—	—
レブリン酸	—	+	N. T.
リンゴ酸	+	+	+
マロン酸	+	—	—
フェニル酢酸	—	+	+
L-アラビノース	+	—	—
フルクトース	+	+	N. T.
グルコース	+	±	+
マンノース	+	—	—
マルトース	—	—	—
キシロース	+	—	—
マシニトール	+	—	—
グルコン酸	+	—	±
2-ケトグルコン酸	+	—	N. T.
N-アセチルグルコサミン	—	—	±
L-セリン	+	+	—



D-酒石酸	+	-	N. T.
馬尿酸	+	-	N. T.
L-酒石酸	+	-	N. T.
m-酒石酸	-	+	N. T.
エタノール	+	-	+
乳酸	+	+	+
スベリン酸	-	-	-
ベンジルアミン	+	-	N. T.
アドニトール	+	-	-
酪酸	+	N. T.	+
D-マンデル酸	-	-	N. T.
トレハロース	-	-	-
D-グルカル酸	-	N. T.	-
L-ラムノース	-	-	N. T.
シトラコン酸	+	-	N. T.
ベンゾイルギ酸	-	-	-
ブチルアミン	-	+	N. T.
m-イノシトール	-	-	-
L-マンデル酸	-	-	-
トリプタミン	-	-	N. T.
イソ酪酸	-	+	N. T.
セバシン酸	-	-	+
ソルビトール	-	-	-
エリスリトール	-	-	N. T.
L-メチオニン	N. T.	-	N. T.
アセトアミド	N. T.	-	-
イタコン酸	N. T.	-	N. T.
ピメリン酸	N. T.	-	N. T.
シュクロース	N. T.	-	-
アゼライン酸	N. T.	-	+
D-ガラクトース	N. T.	N. T.	+
ムコン酸	N. T.	N. T.	+
ガラニオール	N. T.	N. T.	+
プロピレングリコール	N. T.	N. T.	+
n-プロパノール	N. T.	N. T.	+

【0011】

## TRP-7株

## (a) 形態

## (1) 細胞の形および大きさ

桿 菌

0.5~0.6  $\mu\text{m}$   $\times$  1.5~18.0  $\mu\text{m}$ 

## (2) 運動性

+

## (3) グラム染色性

-

## (4) 胞子の有無

-

## (5) 鞭毛

極鞭毛、&gt; 1

## (b) 生理学的性質

## (1) オキシダーゼ

+

## (2) カタラーゼ

+

## (3) アミノペプチダーゼ

+

## (4) インドールの生成

-

## (5) VPテスト

-

(6) 硝酸塩の還元	—
(7) 脱窒反応	—
(8) ウレアーゼ	+
(9) フェニルアラニンデアミナーゼ	—
(10) シュクロースからレバンの生成	—
(11) レシチナーゼ	—
(12) でんぶんの加水分解	—
(13) ゼラチンの加水分解	—
(14) カゼインの加水分解	—
(15) DNAの加水分解	—
(16) Tween80 の加水分解	+
(17) エスクリンの加水分解	—
(18) 3%KOH による溶菌	+
(19) 酸素に対する態度	好氣的
(20) 4℃での生育	+
(21) 37℃での生育	—
(22) 41℃での生育	—
(23) pH5.6 での生育	+
(24) Mac-Conkey-Agar 培地での生育	+
(25) SS-Agar 培地での生育	+
(26) Cetrimid-Agar 培地での生育	+
(27) 色素の生成	
蛍光性	+
ピロシアニン	—
(28) OFテスト	○
(29) グルコースからガスの生成	—
(30) 酸の生成	
グルコース	+
フルクトース	+
キシロース	+
(31) PNPG ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)	—
(32) アルギニンジヒドロラーゼ	+
(33) 炭素源の利用	
アジピン酸	—
カプロン酸	+
クエン酸	+
レブリン酸	+
リンゴ酸	+
フェニル酢酸	+
L-アラビノース	—
フルクトース	+
グルコース	+
マンノース	+
マルトース	—
マンニトール	+
グルコン酸	+
N-アセチルグルコサミン	—
L-バリン	+
アドニトール	—
トレハロース	+

D-グルカル酸	+
ベンゾイルギ酸	+
ブチルアミン	+
m-イノシトール	-
セバシン酸	-
ソルビトール	-
アセトアミド	-
シュクロース	-
アゼライン酸	-
D-ガラクトース	+
ムコン酸	+
ゲラニオール	-
グリシン	-
n-ブタノール	+
D-アラニン	+
アントラニル酸	-
L-トリプトファン	-
L-キヌレン酸	-
α-アミルアミン	-

以上の菌学的性質をバーギーの細菌分類書〔Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986)〕に基づいて分類すると、TRB-2、TRP-4、TRP-7はシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) と同定された。TRP-13株は明確に該当する種がなく、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する新菌種であることが明らかとなった。

【0012】本発明に用いる微生物を培養するための培地は、その微生物が増殖しうるものであれば特に制限はない。例えば、炭素源としては、上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリンなどの糖類、ソルビトール、グリセロール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類およびその塩類、パラフィンなどの炭化水素類などあるいはこれらの混合物を使用することができる。窒素源としては例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、尿素、などの無機有機含窒素化合物、あるいはこれらの混合物を使用することができる。他に無機塩、微量金属塩、ビタミン類など、通常の培養に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。また、必要に応じて微生物の増殖を促進する因子、本発明の目的化合物の生成能力を高める因子、あるいは培地のpH保持に有効なCaCO<sub>3</sub>などの物質も添加できる。

【0013】培養方法としては培地pHは3.0～10.0、好ましくは4～8、培養温度は20～45℃、好ましくは25～

37℃で、嫌気的あるいは好氣的に、その微生物の生育に適した条件下5～120時間、好ましくは12～72時間程度培養する。

【0014】1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物から光学活性な1,2-プロパンジオールを生成させる方法としては、培養液をそのまま用い、該培養液に1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物を添加する方法、遠心分離などにより、菌体を分離し、これをそのまま、あるいは洗浄した後、緩衝液、水などに再懸濁したものに、1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物を添加し反応させる方法などがある。この反応の際、グルコース、シュクロースなどの炭素源をエネルギー源として添加したほうがよい場合もある。また、菌体は生菌体のままでもよいし、菌体破砕物、アセトン処理、凍結乾燥などの処理を施したものでよい。また、これらの菌体あるいは菌体処理物を、例えばポリアクリルアミドゲル法、含硫多糖ゲル法（カラギーナンゲル法など）、アルギン酸ゲル法、寒天ゲル法など公知の方法で固定化して用いることもできる。さらに、菌体処理物から、公知の方法を組み合わせる精製取得した酵素も使用できる。

【0015】1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物はそのまま、あるいは、水に溶解または反応に影響を与えないような有機溶媒に溶解したり、界面活性剤などに分散させたりして、反応始めから一括にあるいは分割して添加してもよい。反応はpH3～10、好ましくはpH5～9の範囲で、温度は10～60℃、好ましくは20～40℃の範囲で、1～120時間程度、攪拌下あるいは静置下で行う。基質である1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物の濃度は特に限定されないが、1～40%程度が好ましい。また、必要に応じてNaOH、CaCO<sub>3</sub>、HC

1、 $H_2SO_4$ などで反応液のpHを保持すると、良好な結果が得られる場合もある。

【0016】反応によって残存生成した光学活性1,2-プロパンジオールの採取は反応液から直接あるいは菌体分離後、有機溶媒による抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィーなどの通常の精製方法を用いれば容易に行うことができる。また、反応の副生物にアルデヒド、ケトンが生じる場合には、亜硫酸水素ナトリウムで処理し、除去することも効果的な方法である。

【0017】

【実施例】以下本発明を具体的に実施例にて説明するが、本発明はこれらの実施例にのみに限定されるものではない。例中の%は特記しない限り重量基準である。尚、実施例における反応液中の1,2-プロパンジオールの定量はガスクロマトグラフィー〔カラム：Thermon 3000 5%/chromosorb W 80~100 メッシュ（ $\phi$  3mm $\times$  2.1 m）、温度140℃〕により容易に行うことができ、光学純度は反応により得られた光学活性1,2-プロパンジオールを常法により、フェニルイソシアネートと反応させフェニルカルバモイル化した後、光学分割カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業製キラルセルOD、溶媒：n-ヘキサン/2-プロパノール=16:3、波長254nm、流速1.0 ml/分、温度45℃）により測定した（保持時間：(R) 体14.2分、(S) 体23.5分）。

【0018】実施例1

下記組成の菌体調製用培地50mlを500ml 容坂ロフラスコに入れ、滅菌後表1に示した微生物をそれぞれ植菌し、30℃で50時間振とう培養を行った。続いて、遠心分離で菌体を分離し、生菌体を得た。

<菌体調製用培地>

ラセミ 1,2-プロパンジオール	1.0 %
肉エキス	0.1 %
酵母エキス	0.1 %
ポリペプトン	0.2 %
$KH_2PO_4$	0.07 %
$(NH_4)_2HPO_4$	0.13 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 %

pH7.2

次に生菌体を脱イオン水に懸濁し25mlとした。これを12.5mlずつ500ml 容坂ロフラスコに入れ12%ラセミ 1,2-プロパンジオール/6% $CaCO_3$ の混合液をフラスコAには12.5ml、フラスコBには8.34ml入れた。フラスコBにはさらに脱イオン水4.16mlを加えて、30℃で48時間振とう反応させた（終濃度、フラスコA：6% 1,2-プロパンジオール、3% $CaCO_3$ 、フラスコB：4% 1,2-プロパンジオール、2% $CaCO_3$ ）。

【0019】反応終了後、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液2mlを塩化ナトリウムで飽和させた後、酢酸エチル2mlを用いて残存する1,2-プロパンジオールを抽出した。抽出液を脱溶媒後、残渣にフェニルイソシアネート50 $\mu$ lを加えて、フェニルカルバモイル化した。これに高速液体クロマトグラフィー移動相2ml（n-ヘキサン/2-プロパノール〔16:3〕）を加えて溶解させ、高速液体クロマトグラフィーにて光学純度を測定した。また、先の上澄液を蒸留水にて適宜希釈した後、ガスクロマトグラフィーにて1,2-プロパンジオールを定量した。得られた1,2-プロパンジオールの絶対配置、および光学純度、残存量を表1に示す。

【0020】

【表1】

微生物	1,2-プロパンジオール仕込み濃度 (%)	1,2-プロパンジオール残存量 (g/リットル)	絶対配置	1,2-プロパンジオール光学純度 (% ee)
シュードモナス プチダ ( <i>Pseudomonas putida</i> )	4	19.1	R	>99
	6	32.8	R	78.9
シュードモナス プチダ ( <i>Pseudomonas putida</i> )	4	16.6	R	>99
	6	30.2	R	91.5
シュードモナス スピーシズ TRP-13 ( <i>Pseudomonas sp.</i> )	4	9.7	R	>99
	6	26.3	R	>99
シュードモナス プチダ TRP-7 ( <i>Pseudomonas putida</i> )	4	17.6	S	>99
	6	26.5	S	>99

## 【0021】実施例2

シュードモナス スピーシズTRP-13、シュードモナス プチダTRP-7株について実施例1と同様の培地、方法で培地50mlを500ml 容坂口フラスコで30℃、50時間、培養した。遠心集菌後脱イオン水に懸濁してそれぞれ25mlとした。実施例1と同様に菌体懸濁液を12.5mlずつ2本の500ml 容坂口フラスコに分注し、フラスコA

には20%ラセミ 1,2-プロパンジオール/10%CaCO<sub>3</sub> 混合液10ml、脱イオン水2.5ml(終濃度: 8% 1,2-プロパンジオール、4%CaCO<sub>3</sub>)、フラスコBには20%ラセミ 1,2-プロパンジオール/10%CaCO<sub>3</sub> 混合液12.5ml (終濃度: 10% 1,2-プロパンジオール、5%CaCO<sub>3</sub>)を加え、30℃、72時間振とう反応させた。反応終了後実施例1と同様にして1,2-プロパンジオールの残存量、光学

純度、絶対配置を調べ、その結果を表2にまとめた。

【0022】

【表2】

微生物	1,2-プロパンジオール仕込み濃度 (%)	1,2-プロパンジオール残存量 (g/リットル)	絶対配置	1,2-プロパンジオール光学純度 (%ee)
シュードモナス スピース TRP-13 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	8	42.8	R	96.8
	10	63.7	R	65.1
シュードモナス プチダ TRP-7 ( <i>Pseudomonas putida</i> )	8	37.6	S	>99
	10	47.8	S	>99

### 【0023】実施例3

B. ブラウン社製2リットル小型培養槽に実施例1と同様の培地を1.2リットル仕込み、121℃、15分間滅菌した。冷却後、シュードモナス スピース TRP-13株を下記に示す培地にて30℃、25時間、振とう培養 (10ml/φ21mm試験管) して得た培養液12mlを無菌的に接種し、30℃、700rpm、0.5vvmの条件で18.5時間培養した。

<培地>

グルコース	0.5 %
肉エキス	0.3 %
酵母エキス	0.3 %
ポリペプトン	0.5 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07 %
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 %

pH7.2

培養終了後1リットル分の培養液を遠心分離し、生菌体を得、次いでこれを脱イオン水に懸濁し、200mlとした。これに800mlの7.5%ラセミ 1,2-プロパンジオール/3.75%CaCO<sub>3</sub> 混合液を加え (終濃度: 6% 1,2-プロパンジオール、3%CaCO<sub>3</sub>)、上記の小型培養槽にて、30℃、700rpm、0.5vvmにて79.5時間反応を行った。反応終了時点の(R)-1,2-プロパンジオールの光学純度は99.8%ee、(R)-1,2-プロパンジオールの収率は97.7%であった。

【0024】反応終了液を遠心分離して上清を得、次いでミリポア社製の限外ろ過膜 (分子量1万カット) を通して、高分子物質を除いた。これをロータリーエバポレーターで106gまで濃縮し、析出した白色結晶をろ過にて除いた。ロ液を再び濃縮し、40.2gとした。この濃縮液に対して、酢酸エチルにて抽出を行った。酢酸エチル層を集め、脱溶媒した。この残渣に亜硫酸水素ナトリウムの飽和水溶液5mlを加え、室温1時間攪拌した。これをジエチルエーテルにて抽出し、エーテル層を得た後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後脱溶媒した。残渣を5mmHgにて蒸留し、精製(R)-1,2-プロパンジオール8.6gを得た。ガスクロマトグラフィー面積比98.4%、光学純度99.3%e.e.、 $[\alpha]^{25}_D -23.8^\circ$  (c=0.992、H<sub>2</sub>O)。

### 【0025】

【発明の効果】本発明の微生物を用いた光学活性1,2-プロパンジオールの製法は、簡便に光学純度の高い光学活性1,2-プロパンジオールを製造することを可能にさせるものであり、工業的に極めて有利である。

フロントページの続き

(51) Int, Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:40)				
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:40)				